

24. 3. 2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 3月31日
Date of Application:

出願番号 特願2003-095242
Application Number:
[ST. 10/C]: [J. P 2003-095242]

出願人 独立行政法人 科学技術振興機構
Applicant(s): 株式会社ファクト

REC'D 21 MAY 2004

WIPO

PCT

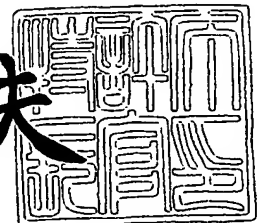
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月30日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 200303097

【提出日】 平成15年 3月31日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 5/06

【発明者】

 【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区八幡五丁目 3 番 1 0 - 4 0 2 号

 【氏名】 帯刀 益夫

【発明者】

 【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区小松島二丁目 1 1 番 7 号

 【氏名】 鈴木 義久

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

 【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区八幡五丁目 3 番 1 0 - 4 0 2 号

 【氏名又は名称】 帯刀 益夫

【特許出願人】

 【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区小松島二丁目 1 1 番 7 号

 【氏名又は名称】 鈴木 義久

【代理人】

 【識別番号】 100060782

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 小田島 平吉

【選任した代理人】

 【識別番号】 100094293

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 藤井 幸喜

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 019666

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 幹細胞の分化誘導

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 多能性幹細胞を发育させる過程で、該細胞と作用剤との接触を介することによる該細胞の分化誘導方法であって、

該細胞と作用剤との接触が、該細胞の i) 第一发育段階、ii) 第二发育段階、iii) 第三发育段階前期、iv) 第三发育段階後期、v) 第四发育段階前期およびvi) 第四发育段階後期からなる发育フェーズの最大で4つのフェーズにおいて実施され、そして

該作用剤が該細胞を少なくとも2つの方向への細胞の分化を促進および/または抑制しうる物質であることを特徴とする細胞の分化誘導方法。

【請求項 2】 多能性幹細胞が、骨髓間質細胞である請求項 1 記載の細胞の分化誘導方法。

【請求項 3】 骨髓間質細胞が、温度感受性 SV-40 T 抗原遺伝子を担持するトランスジェニックマウス由来である請求項 2 記載の細胞の分化誘導方法。

【請求項 4】 細胞の分化が、少なくとも平滑筋細胞、骨形成細胞および脂肪細胞のいずれか2つの分化細胞に向かう請求項 1 または 2 記載の細胞の誘導方法。

【請求項 5】 作用剤が、細胞の分化の促進または抑制をもたらしうるサイトカインである請求項 1～3 のいずれかの一つに記載の細胞の誘導方法。

【請求項 6】 サイトカインが、オンコスタチン M (OSM)、骨形成因子-2 (BMP-2)、骨形成因子-4 (BMP-4)、グロース・ディファレンシエーション・ファクター 5 (GDF-5) およびトランスフォーミング増殖因子 (TGF- β 2) からなる群より選ばれる請求項 4 記載の細胞の誘導方法。

【請求項 7】 多能性幹細胞を发育させる過程で、該細胞と作用剤との接触を介することによる該細胞の分化誘導方法を用いる作用剤についての細胞分化の促進または抑制能の評価方法であって、

該細胞と作用剤との接触が、該細胞の i) 第一发育段階、ii) 第二发育段階、

iii) 第三発育段階前期、iv) 第三発育段階後期、v) 第四発育段階前期およびvi) 第四発育段階後期からなる発育フェーズの最大で4つのフェーズにおいて実施され、そして

該作用剤が該細胞を少なくとも2つの方向への細胞の分化を促進および/または抑制することが期待される候補作用物質であることを特徴とする評価方法。

【請求項8】 多能性幹細胞が、温度感受性SV-40 T抗原遺伝子を担持するトランスジェニックマウス由来である請求項7記載の評価方法。

【請求項9】 候補作用剤による該細胞の分化の程度が、多能性幹細胞を発育させる過程で該細胞が該細胞の分化の促進または抑制をもたらさうるサイトカインと接触されてもたらされる分化の程度と比較される請求項7または8記載の評価方法。

【請求項10】 サイトカインが、オンコスタチンM(OSM)、骨形成因子-2(BMP-2)、骨形成因子-4(BMP-4)、グロース・ディファレンシエーション・ファクター5(GDF-5)およびトランスフォーミング増殖因子(TGF- β 2)からなる群より選ばれる請求項9記載の評価方法。

【請求項11】 請求項1、2および4～6のいずれかの一つに記載の細胞の誘導方法により誘導された細胞を主体とする再生医療用調製物。

【請求項12】 細胞が哺乳動物由来である請求項11記載の調製物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は動物細胞の培養、より具体的には、多能性幹細胞の培養による分化誘導方法および該誘導方法を用いるある物質の該細胞に対する分化能の評価方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

再生医療に利用しうる技術の開発または基本的な知見の収集を目差し、動物細胞の増殖・分化の促進や抑制について精力的な研究が行われている。このような増殖・分化の重要な制御因子として、サイトカインの各種細胞への作用も調べら

れている。こうして、サイトカイン機能の多様性（サイトカインは同一のレセプターを介して細胞ごとに異なる作用を示す。例えば、B細胞活性化因子としてクロニングされたIL-6は、B細胞のみならず肝細胞、神経細胞、血液幹細胞などに幅広く作用し、プラズマ細胞の増殖を強く促進するが、M1マクロファージ細胞に作用すると増殖を抑制し分化を促進する。）、並びにサイトカイン機能の重複（異なるサイトカインのレセプターが同一のシグナル伝達サブユニットを共有することで、同じシグナル伝達経路を活性化して同じ作用を示す。）ことも周知である（例えば、非特許文献1参照。）。

【0003】

また、血液細胞系以外でも、温度感受性SV-40 T抗原遺伝子を担持するトランスジェニックマウスから樹立された、筋形成性、骨形成性および脂肪生成性分化を示す、骨髄間質細胞（TBR細胞系統）のある株（TBRB）はオンコスタチンM（OSM）により骨格筋への分化が刺激され、他のある株（TBR31-2）は、OSMにより骨形成性分化が刺激されるが、脂肪生成性分化は抑制されることが確認されている（非特許文献2参照。）。なお、TBR細胞株の一般的な作製方法および具体的な株についての詳細も公表されている（例えば、特許文献1、ならびに非特許文献3および4参照。）。非特許文献3および4には、TBR細胞株はT抗原の不活化や増殖条件に応じて表現型変化を示し、脂肪前駆細胞が脂肪細胞および骨形成性細胞に誘導され、いくつかの脂肪前駆細胞および内皮細胞株は筋細胞および脂肪細胞に誘導される、ことも記載されている。このような性質からTBR細胞は多能性間葉系幹細胞由来であることが示唆されている。また、間葉系幹細胞から、骨細胞、軟骨細胞、腱細胞、靱帯細胞、骨格筋細胞、脂肪細胞、間質細胞等へ誘導できることも知られている（非特許文献5参照。）。

【0004】

さらに、心筋細胞への分化能を有する骨髄由来の細胞が5-アザシチジン等のDNAの脱メチル化剤の投与により、確率的（stochastic）に心筋細胞、脂肪細胞および骨格筋細胞の系列に分化され、さらにFGF-8、ET1、Midkine、BMP4の4種類のうち少なくとも一種のサイトカインと5-アザシチジンとを

組み合わせて添加することで心筋特異的な遺伝子の発現を促進できることが示唆されている（例えば、特許文献2参照。）。また、特許文献2には、こうして得られる細胞を用いて該細胞を増殖する因子をスクリーニングする方法も記載されている。

【0005】

【特許文献1】

特開平5-292958号公報

【0006】

【特許文献2】

国際公開第01/48151号パンフレット、特に4頁2-11行、53頁-55頁

【0007】

【非特許文献1】

イラスト医学&サイエンスシリーズ「サイトカインの機能を探る」1998、12、10、第1刷発行、株式会社 羊土社、12-19頁

【0008】

【非特許文献2】

In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal 37:698-704 (2001)、
要約部

【0009】

【非特許文献3】

J. Cellular Physiology 164:55-64 (1995)

【0010】

【非特許文献4】

Experimental Cell Research 218、424-429 (1995)

【0011】

【非特許文献5】

Science 284、143-147 (1999)

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

以上述べたとおり、当該技術分野では、ES細胞だけでなく、ある一定の骨髄由来の細胞（造血幹細胞を除く。）が多分化能を有し、特定の分化形質を発現し、機能的な細胞、さらには組織や器官になることが知られており、そしてサイトカインの使用により分化の方向性（新しい分化形質の発現性）を調節することも示唆されている。しかしながら、分化の方向性をさらに的確に調節し得る手段が提供できることが望ましいであろう。

【0013】**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、多能性幹細胞の分化の方向性および分化の程度にサイトカインが及ぼす影響について、緻密に検討してきたところ、上述したようなサイトカイン機能の多様性は、異なる細胞間だけでなく、同系統細胞の異なる特定の生育フェーズにおいても観察されることを見出した。本発明はこのような知見に基いて完成されたものである。

【0014】

したがって、本発明によれば、多能性幹細胞を发育させる過程で該細胞と作用剤との接触を介することによる該細胞の分化誘導方法であって、

該細胞と作用剤との接触が、該細胞の i) 第一发育段階、ii) 第二发育段階、iii) 第三发育段階前期、iv) 第三发育段階後期、v) 第四发育段階前期およびvi) 第四发育段階後期からなる发育フェーズの最大で4つのフェーズにおいて実施され、そして

該作用剤が該細胞を少なくとも2つの方向への細胞の分化を促進および／または抑制しうる物質であることを特徴とする細胞の分化誘導方法が提供される。

【0015】

また、別の態様の本発明として、前記細胞の分化誘導方法を用いる候補作用剤についての細胞分化の促進または抑制能の評価方法であって、該候補作用剤（もしくは被検物質）が多能性幹細胞の前記发育フェーズの最大4つのフェーズにおいて、該細胞と接触されることを特徴とする評価方法が提供される。このような評価方法は、限定されるものでないが、多能性幹細胞の増殖および／または分化

を調節しうる後述するサイトカインと同様もしくは向上した物質（ペプチド性もしくは非ペプチド性）のスクリーニングに用いることができる。

【0016】

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

【0017】

本発明で用いることのできる多能性幹細胞は、本発明の目的に沿うものであれば、ES細胞を初めとし、いずれかの作用剤より、生来の細胞から、2以上の新しい分化形質が発現し、機能的な細胞または組織や器官になりうる細胞であれば、骨髄、脳、肝臓、その他の臓器から単離できた細胞、さらには該細胞の初代培養細胞、継代培養細胞、不死化細胞のいずれであってもよい。しかし、好ましくは、骨髄由来の間葉系細胞である幹細胞を用いることができる。また、単離または樹立された細胞株であって、予備的に骨髄間質細胞とか、間葉系幹細胞と称されているものであっても、本発明の目的に沿う限り、本発明にいう多能性幹細胞に包含される。したがって、上記の非特許文献3～4に記載の多能性を示す細胞がより具体的なものとして挙げられる。また、これらに記載の細胞と分化の方向性、分化される程度等について同等の特性をもっていれば、細胞の起源を問うことなく使用でき、例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ブタ、ウシ、サル、ヒト等の哺乳動物由来の細胞であることができる。限定されるものでないが、本発明の作用、効果を確認する上で、都合のよい多能性幹細胞としては、前述の非特許文献3または4に記載されているような、温度感受性SV-40 T抗原遺伝子のトランスジェニックマウスから樹立されたTBR株（または系）と称されているものが挙げられる。なお、これらの非特許文献3および4は、共著者として、本発明者の一人である帯刀益夫博士が含まれているとおり、上記のTBR株の特定の株、例えばTBR31-2、同10-1等は、仙台市青葉区星陵町4-1 東北大学 加齢医学研究所から、試験、研究の目的に使用することを前提に、制限なく分譲される。

【0018】

このような多能性幹細胞を発育させる過程は、イン・ビトロ (in vitro)、エクス・ビボ (ex vivo) およびイン・ビボ (in vivo) のいずれの発育過程である

ことができるが、殊に、前二者における発育過程が注視されている。このような発育過程は、細胞の人工的な培養における細胞の各種発育段階（または発育フェーズ）を包含し、具体的には以下の段階からなる。

【0 0 1 9】

- i) 第一発育段階：若い未熟な、細胞の突起を盛んに伸長させており、かつ増殖段階に入っていない細胞が観察される；
- ii) 第二発育段階：細胞数が増大する直前の段階にあり、且つ細胞の突起を盛んに伸長させ、隣接する細胞の突起同士の接触が起こる直前～直後にあり、細胞体積の膨張が最大になった細胞が観察される；
- iii) 第三発育段階前期：対数増殖的な発育が開始され、隣接する細胞の突起同士の接触が90%以上起こった状態にある細胞から、細胞本体同士が完全に接触して増殖する面積がない状態を100とした時に、細胞の密度が60%に達した状態にある細胞、すなわち60%コンフルエントの状態になった細胞が観察される；
- iv) 第三発育段階後期：対数増殖的に活発に増殖している60%コンフルエント状態の細胞から増殖がとまりつつある100コンフルエント状態に向かっていく細胞であり、かつ成熟した細胞に向かいつつある細胞が観察される；
- v) 第四発育段階前期：100%コンフルエント状態にある細胞が、まだわずかに増殖を行っており、増殖停止直前の細胞が観察される；および
- vi) 第四発育段階後期：細胞の増殖段階を終えた成熟した細胞が観察される。

【0 0 2 0】

図-2 および図-3 も参照されたい。

【0 0 2 1】

従来の技術によれば、サイトカインが用いられる場合には、細胞の培養は培養の全期間を通じてサイトカインを含む培地で行われるので、細胞は培養初期から培養終了時まで連続してサイトカインと接触（もしくは曝露）されるが、本発明では、上記の i) ～vi) の発育フェーズのうち、最大で4つのフェーズにおいて細胞が、少なくとも2つの方向への該細胞の分化を促進および／または抑制しう

る物質（好ましくはいずれかのサイトカインである。）と接触されることが重要である。このような接触を行うか否かは、細胞を発育させる過程、典型的には細胞の培養中、例えば2～4日毎に培地の交換が行われるが、この交換培地に前記物質を存在させるか存在させないかによって、容易に行うことができる。最大で4つのフェーズは、例えば、iii) 第三発育段階前期とiv) 第三発育段階後期とv) 第四発育段階前期とvi) 第四発育段階後期、等からなることができるが、i) 第一発育段階とii) 第二発育段階とiii) 第三発育段階前期、等の3つのフェーズ、i) 第一発育段階とii) 第二発育段階、iv) 第三発育段階後期と v) 第四発育段階、等の2つのフェーズ、さらには、前記6つのフェーズのいずれか一つのフェーズをも包含する。

【0022】

本発明に従えば、このようないずれかのフェーズにおける培地中に、生育されている細胞に分化誘導を行いうる濃度で、好ましくは、いずれかのサイトカインが加えられる。このようなサイトカインとしては、限定されるものでないが、オンコスタチンM (OSM)、骨形成因子-2 (BMP-2)、骨形成因子-4 (BMP-4)、グロース・ディファレンシエーション・ファクター5 (GDF-5) およびトランスフォーミング増殖因子 (TGF- β 2) を挙げることができる。

【0023】

例えば、非特許文献2によれば、前記のTBR31-2の全培養期間（前記のi)～vi)の発育フェーズ）を通じて該細胞株を連続してOSMと接触させた場合には、上述のごとく、骨形成性分化が刺激（または骨形成細胞への分化誘導が促進）される。しかし、脂肪生成性分化は抑制（または脂肪細胞への分化誘導は抑制）される。これに対し、本発明によれば、OSMを前記のiv)～vi)の発育フェーズのみならず前記のvi)の発育フェーズのみにおいて存在させたときですらTBR31-2から脂肪細胞への分化誘導は抑制される。さらに重要な知見は、非特許文献2に記載のごとく、TBR31-2を、前記のi)～vi)の発育フェーズを通じてOSMの存在下で培養すると、平滑筋への分化誘導は抑制されるのに対し、逆に、i)～iii)の発育フェーズ、またはiii)、iv)およびv)の

発育フェーズのいずれか一つの発育フェーズにおいて O S M の存在下で T B R 3 1-2 を培養すると平滑筋への分化誘導は促進されることである。

【0024】

すなわち、多能性幹細胞の発育系において、該細胞に対するサイトカインの作用を評価しようとする場合には、該細胞とサイトカインの接触のタイミングによって分化誘導の方向性が逆になることがあるのである。かくして、多能性幹細胞に対するサイトカイン等の作用剤の作用を的確に確認するためには、前記の i) ~vi) の 6 つの発育フェーズにおけるいずれか適当な 1 ~ 4 の発育フェーズにおいて、該作用剤の作用を確認することが好ましい。

【0025】

それ故、本発明に従う、多能性幹細胞の分化誘導方法を、該細胞に対する各種候補作用剤（または被検物質）の評価に応用すると、かような作用剤の的確な分化誘導能についての評価が可能になる。このような、評価方法においては、培養が容易で、培養結果の評価を容易に行うことのできる、温度感受性 S V-40 T 抗原遺伝子を担持するトランスジェニックマウス由来の骨髄間質細胞（T B R 系細胞）を用いることが便宜である。このような評価方法の好ましく、またはより具体的な態様は、次のように記載することもできる。

【0026】

A) T B R 系細胞をそれらの栄養培地で生育させる際に、生育過程もしくは培養における該細胞の i) 第一発育段階、ii) 第二発育段階、iii) 第三発育段階前期、iv) 第三発育段階後期、v) 第四発育段階前期およびvi) 第四発育段階後期からなる発育フェーズの最大で 4 つのフェーズにおいて、適当な濃度の被検物質の存在下で培養し、

B) 培養細胞がいずれかの分化形質を有する細胞に転換するか否か（または培養細胞に分化誘導が生じたか否か）を検出し、

C) 検出の結果に基づいて、被検物質が多能性幹細胞に対する分化誘導能または細胞の分化の促進もしくは抑制作用を有するか否かを判断する、ことを特徴とする評価方法。

【0027】

このような評価方法では、比較またはポジティブ対照として、被検物質を含まず、骨形成因子-2 (BMP-2)、骨形成因子-4 (BMP-4)、オンコスタチンM (OSM)、グロース・ディファレンシエーション・ファクター (GDF-5) およびトランスフォーミング増殖因子 (TGF- β 2) からなる群より選ばれるサイトカインの存在下で上記の培養を行った結果と比較する工程を含めることにより、被検物質の多能性幹細胞に対する作用を、より具体的に評価することができる。

【0028】

以上の分化誘導方法および評価方法では、TBR系細胞株を初めとする動物細胞を培養することのできる、それ自体公知の培養条件をそのまま、あるいは改良して用いることができる。例えば、培地としては、基本的には、必須栄養源が添加してあり、アミノ酸では、動物（哺乳類）が合成できない必須アミノ酸のL-アルギニン、L-システイン、L-チロシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-バリン、L-グルタミンを基本として加えてあり、場合によっては生育を良くする目的で、非必須アミノ酸のL-グリシン、L-セリンも添加したものであれば、どのような培地でも利用できる。培養温度、等のその他の条件は、温度条件など、そのほかに、CO₂インキュベーター中の気相のCO₂と共同して培地のpHを安定化させるために添加するバッファー剤として、細胞が炭酸水素イオンを必要とすることから、一般的には炭酸水素系の重炭酸ナトリウム溶液を加えるか、さらにHEPESなど添加して、CO₂インキュベーターから外に取り出してもpHが安定に保てるように工夫してよい。また、適宜、雑菌の汚染を防ぐために、抗生物質を加えてもよい。本発明に従えば、培地から必要に応じて、血清その他の作用剤を除去し、サイトカインが添加される。他方、in vitro では、生理学的または使用するサイトカインに悪影響を及ぼさない媒体中にサイトカインを含有せしめた形態が採用できる。かような媒体の例としては、限定されるものでないが、無菌水、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水であることができる。

【0029】

in vitro および ex vivo で使用する場合は各サイトカインの使用量は、後述する実施例における使用量を参照して、必要があれば、さらに小実験を行って最適量を決定すればよい。in vivo で使用する場合は通常 $0.1 \text{ ng/ml} \sim 20 \text{ ng/ml}$ の用量であることができる。他方、培養温度は、 $33^{\circ}\text{C} \sim 37^{\circ}\text{C}$ であることができる。

【0030】

また、分化誘導の生じた細胞の同定方法は、それ自体既知の方法によることができ、具体例としては後述する実施例に記載の方法によればよい。

【0031】

さらなる別の態様の本発明として、前記の分化誘導方法により得られた分化細胞を主体とする再生医療用調製物も提供できる。こうして、本発明によれば、心臓、毛細血管、動脈及び静脈などの血管系の臓器、胃、食道、結腸、直腸、小腸、大腸などの消化器系の臓器、手足の筋肉、気管、子宮、膣や脂肪組織などの再生医療に利用できる手段が提供できる。

【0032】

また、上記の評価方法によれば、各分化の程度を制御できる作用剤のスクリーニング系を構築できる。

【0033】

【実施例】

以下、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものでない。

(1) : 分化誘導された細胞または分化細胞の同定または検出

(1-1) 平滑筋細胞については、60mmプラスチックディッシュに培養した細胞集団のなかに顕微鏡学的に単核で紡錘形 (spindle shape) を示す細胞を観察し、その培養細胞集団から抽出した蛋白質混合物から平滑筋細胞に特異的に発現するミオシン軽鎖キナーゼ (sm-MLC K) または α -アクチン (α -sm-Actin) を検出するために、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって蛋白質を分離し、分離したゲル上の蛋白質をメンブレンに転写し (WB法)、メンブレン上の sm-MLC K に特異的に反応する一次抗体 (Sigma 製、Monoclonal

Anti-Myosin Light Chain Kinase、mouse IgG 2b, clone K36, Product No. M7905) または α sm-Actin に特異的に反応する一次抗体 (Sigma 製、Monoclonal Anti- α Smooth Muscle Actin, mouse IgG 2a isotype, clone 1A4, Product No. A2547) とそれを検出するための horseradish peroxidase (HRP) で標識した二次抗体 (ICN 製、Goat, anti-mouse IgG F(ab')₂, IgG、カタログ No. 55553) を使用することによって同定した。

(1-2) 培養ディッシュ中の細胞核の観察は培養液の除去後、濃度 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調製した染色液ヨウ化プロピジウム (PI) を添加し、染色液との反応処理を室温で5分間行い、染色液を除去しリン酸バッファ緩衝液 (PBS) を用いて洗浄した。PBSによる洗浄処理は各々5分間、3回行った。

(1-3) 骨化細胞については、骨芽細胞にはアルカリホスファターゼ (以下 ALP) が比較的高濃度に存在し、さらにヒドロキシアパタイトの形をとったカルシウムが沈着していることが知られているので、前者の ALP 染色法、及び後者のコッサ反応によって骨化細胞を同定した。この HRP 標識の二次抗体の検出は化学発光検出試薬 (アマシャム製、ECL Plus ウェスタンブロッティング検出キットによる化学発光を X 線フィルム (コダック製、XAR-5) で行った。まず ALP 法について、60 mm プラスチック培養ディッシュ中の培養液を除去しディッシュ底に付着した細胞を PBS で3分間ずつ3回洗浄した後、70% 冷エタノール溶液を用いて、氷上で10分間静置して固定し、次いで蒸留水で3回洗浄した後に、表-1に示した ALP 反応液を注加し 37℃ 下で4時間静置した。

【0034】

【表 1】

表-1 ALP反応液

試 薬			
0.05M トリス 塩酸緩衝液 (pH8.5)	A液: 0.2M トリス 水溶液	トリス(ヒドロキシメ チル)アミノメタン 2.42gを蒸留水100ml に溶かす。	A液50mlとB液 19.2mlを混和し、 全量を200mlとす る。
	B液: 0.2M 塩酸	塩酸(36.7%、比重1.19) 1.68mlを蒸留水に加 え、100mlとする。	
反応液	基質のナフトール AS-BI リン酸ナトリウム塩5.0mgをDMSO 0.25mlに溶かす。これに蒸留水を25ml添加し、0.05M トリス 塩酸緩衝液 (pH8.5) 25mlを加えて混和し、この溶液にファース スト赤TR塩30mgを溶かす。		

【0035】

この間、顕微鏡でピンク色に細胞が染色されているかの観察を適宜行った。蒸留水で3回洗浄した後、マイヤーのヘマトキシリン溶液（和光純薬工業株式会社製 病理研究用 No. 131-09665）を注加し、室温に5分間放置して核染色を行った。軽く水洗いし、ぬるま湯に漬けて色だしを行った。最後に蒸留水で3回洗浄した。コッサ反応について、60mmプラスチック培養ディッシュ中の培養液を除去しディッシュ底に付着した細胞をPBSで3分間ずつ3回洗浄した後、10%冷ホルマリン溶液を用いて、氷上で10分間静置して固定し、次いで蒸留水で2回洗浄した。5%硝酸銀溶液を注加し、部屋の間接光下でカルシウム沈着部が黒褐色になるまで反応させた後、蒸留水で3回洗浄した。ついで5%チオ硫酸ナトリウム溶液に注加し、3分間静置して定着処理を行った後、蒸留水による洗浄を3回行った。さらに、対比染色のために、表-2に示したケルンエヒトロー液（を加え5分間静置した後に、蒸留水で3回洗浄した。骨化細胞の評価は顕微鏡による観察によって行った。

【0036】

【表 2】

表-2 コッサ反応

試 薬	調 製 方 法
5%硝酸銀液(使用直前に調製)	硝酸銀5gを蒸留水100mlに溶かす。
5%チオ硫酸ナトリウム液	チオ硫酸ナトリウム5gを蒸留水100mlに溶かす。
ケルンエヒトロート液	ケルンエヒトロート0.1g(メルク製)、硫酸アルミニウム5gをそれぞれ、蒸留水100mlに煮沸溶解し、冷却し濾過する。

【0037】

(1-4) 内皮細胞については、35mmプラスチックディッシュに培養した細胞集団のなかに顕微鏡学的に敷石(cobblestone)状の形態を示す細胞を観察し、1,1'-ジオクタデシル-3,3,3'-テトラメチルインドカルボシアニンパークロレート標識アセチル低密度リポプロテイン(DiI-Ac-LDL:製品No.L-3484、Molecular Probes 製, USA)の取り込み能を確認することにより同定した。具体的には培養ディッシュ中の培養液を細胞に傷を付けないように吸い取って捨て、無血清培地で $10\mu\text{g/ml}$ に調製したDiI-Ac-LDLを添加し4時間、 33°C で培養した。PBSにて5分間3回洗浄することによって取り込まなかったDiI-Ac-LDLを除き、3%フォルムアルデヒド溶液を添加し、20分間室温に放置して固定した。蒸留水で洗浄した後、ローダミンフィルターを用い、蛍光顕微鏡で観察した。

(1-5) 脂肪細胞については、培養した細胞集団のなかに顕微鏡学的に脂肪球を持った細胞を観察し、オイルレッド染色法によって同定した。培養ディッシュ中の培養液を除去しディッシュ底に付着した細胞をPBSで3分間ずつ3回洗浄した後、3%のホルマリン溶液を用いて、10分間室温に静置して固定し、次いで80%のイソプロパノールによって1分間置換し、 37°C で10分間、オイルレッドで染色した。さらに60%イソプロパノールを使って1分間分別した後、3分間ずつ2回洗浄し、最後に核染色のためにマイヤのヘマトキシリン溶液(和光製)によって10分間処理し、2分間流水で洗浄した後に、顕微鏡学的に赤

く染まった脂肪細胞を確認した。また、この脂肪細胞は成熟すると明確な脂肪球を持った細胞に発育するので、染色しなくとも脂肪細胞として容易に判定できた。

(1-6) 細胞の測定については、培養液を除去した後に、1 ml の EDTA・トリプシン溶液 (0.02 g EDTA・3 Na / 100 ml の PBS 溶液、0.002 g トリプシン / 100 ml の PBS 溶液) を添加し細胞を洗浄した。この洗浄操作は細胞が剥がれる前にすばやく 2 回行うが、トリプシン溶液を添加し、万遍なく細胞表面に広がった直後にトリプシン溶液をパスツールピペットですばやく吸い取り除去した。次いで顕微鏡で細胞が完全に剥がれているのを確認後、RITC 培地 5 ml を 60 mm プラスティッシュに添加し、ピペットの出し入れで洗い剥ぎ取った細胞を 10 ml 遠沈管に移し、その溶液中の細胞数を 60 mm ディッシュ当たりの数に換算した。細胞数の測定はエルマのビルケルチュルク血球計算盤を用いて行った。

【0038】

細胞の体積 (packed cell volume; PCV) の測定については、上記のようにして調製した溶液中の細胞数を 4 ml 当たりの数に換算した。その後、ヘマトクリット遠沈管 (1 メモリ = 1 μ l、全容量 10 μ l) に、その溶液 4 ml を添加し、1000 rpm で 3 分間遠心し、沈下した細胞の体積を読みとり、細胞数 10⁵ 個当たりの体積を測定した。使用した遠心機は日立工機 (株) 製、CF7D である。

(2) : 細胞の培養

(2-1) 比較培養

下記表-3 に示す 2% FBS の RITC 80-7 培地 (以下、RITC 培地) を用い、90 mm プラスチックディッシュで細胞同士がくっ付き合う直前のサブコンフルエント状態 (80% 程度のコンフルエント) まで培養した。培養液を除去した後に、1 ml の EDTA・トリプシン溶液 (0.02 g EDTA・3 Na / 100 ml の PBS 溶液、0.002 g トリプシン / 100 ml の PBS 溶液) を添加し細胞を洗浄した。この洗浄操作は細胞が剥がれる前にすばやく 2 回行うが、トリプシン溶液を添加し、万遍なく細胞表面に広がった直後にトリプシン

溶液をパスツールピペットですばやく吸い取り除去した。次いで顕微鏡で細胞が完全に剥がれているのを確認後、再び表-3に示すRITC培地を添加し、細胞濃度を 1.2×10^4 個/mlに調製した。この細胞浮遊液4.0mlを60mmプラスチックディッシュに添加し、細胞を均質に分散させた後、33℃で培養した。

【0039】

【表3】

表-3 RITC80-7培地

項 目	添加量/ミリQ水 1000ml	備 考
水酸化ナトリウム	0.3 g	和光純薬 (特級)
重炭酸ナトリウム(特級)	1.4 g	和光純薬 (特級)
HEPS	3.3 g	シグマ. No. H-3375
RITC80-7	9.83 g	岩城硝子(株)No. 99-591-PS
トランスフェリン (10mg/ml)	1ml	ITOHAM FOODS INC. No. 30601293
r. h EGF (10 μ g/ml)	1ml	RSD. No. 236-EG-200
インシュリン(1mg/ml)	1ml	Shimizu Seiyaku Co. Ltd. Batch No. DC18B
FBS(ウシ胎仔血清)	20ml	Gibco. BRL. lot No. A0247611

【0040】

細胞の分化能に及ぼすサイトカイン類の添加の効果について、細胞培養には表-3に示したRITC培地を用い、培養開始12時間後に新しいRITC培地に交換した。培地交換を3日または4日毎に行った。サイトカイン類の添加は培地交換の都度に行い、その量は表-4に示すとおりである。

【0041】

【表4】

表-4 サイトカインの添加量

種 類	調製濃度	添加量/4.0ml培地	最終濃度	備 考
BMP-2	10 μ g/ml	8 μ l	(20ng/ml)	RSD製
OSM	25 μ g/ml	1.6 μ l	(10ng/ml)	同上
GDF-5	50 μ g/ml	0.8 μ l	(10ng/ml)	同上
TGF- β 2	1 μ g/ml	20 μ l	(5ng/ml)	同上
BMP-4	10 μ g/ml	8 μ l	(20ng/ml)	同上

【0042】

また、細胞分化の判定は以下に記述する基準によって行った。すなわち平滑筋については、顕微鏡学的に単核で紡錘形 (spindle shape) を示す細胞を観察し、更にその培養細胞集団から抽出した蛋白質混合物から平滑筋細胞に特異的に発現するミオシン軽鎖キナーゼ蛋白質または α -アクチン蛋白の発現を上述のWB法で判定した。脂肪細胞については、脂肪球を形成している単位当たり (3.8 mm²) の細胞数を測定し、その平均値を求めた。

(2-2) 例1~12 (例1~5は参考例)、および比較例1~2に使用した株化した間葉系幹細胞TBR31-2は上述の非特許文献3または4に記載されたとおり1995年に樹立され、脂肪及び骨細胞への分化能を有することが示された。本発明者らは同株と下記の表-5に示した α -MEM培地と高い血清濃度のウシ胎仔血清 (10% FBS) を用いて培養条件を詳細に研究し、脂肪及び骨細胞に平滑筋や内皮細胞を加えた4つの表現型に分化する能力をもつ幹細胞であることを明らかにし (図1-aおよび表-6参照)、さらにこれらの分化の比率を、無血清または低濃度血清0.7% FBSのRITC培地とサイトカイン類によって自由に変えることができる技術を開発した (例1~5)。すなわち、平滑筋細胞の分化マーカーである α -アクチンの発現 (表-6および図4 (a) 参照) と脂肪細胞への分化の結果が示すように (例1~5)、例1のOSMは平滑筋及び脂肪細胞への分化を共に抑制するが、例2のBMP-2及び例3のBMP-

4 は平滑筋、及び脂肪細胞への分化を共に促進する。一方、例 4 の G D F - 5 は平滑筋への分化を抑制するが、脂肪への分化を促進し、逆に例 5 の T G F - β 2 は平滑筋への分化を促進するが、脂肪細胞への分化を抑制する。

【0043】

【表 5】

表-5 α -MEM 培地

項 目	添加量/ミリQ 水1000ml	備 考
重炭酸水素ナトリウム	2.2 g	和光純薬(特級)
α -MEM	10.1 g	和光純薬(特級)
2-メルカプトエタノール (100mM)	0.25 ml	シグマ. No. M-6250
F B S (ウシ胎仔血清)	1.00 ml	Gibco, BRL lot No. A0247611

【0044】

【表 6】

表-6 間葉系幹細胞 TBR 31-2 の平滑筋、骨及び脂肪細胞への分化に及ぼすサイトカイン類の影響 (RITC 80-7、37℃、25日間)

分化能	例 1	例 2	例 3	例 4	例 5	比較例 1
	OSM (10ng/ml) *	BMP-2 (20ng/ml)	BMP-4 (20ng/ml)	GDF-5 (100ng/ml)	TGF- β 2 (10ng/ml)	
平滑筋 (α -sm-Actin)	—	+++	+++	±	++++	++
脂肪細胞 **	0	413	689	117	0	15

*: () 内の数値は添加した培地中の最終濃度を示す。

** : 3.8 mm²あたりの脂肪細胞数を万遍なく5箇所測定し、その平均値を示す。

【0045】

記号: 図4 (a) による、平滑筋の分化マーカー α -sm-Actin の発現を化学発光によって検出したときの発現量の程度を示す。++++: かなり強く発現、+++ : 強い発現、++ : やや強い発現、+ : 明らかな発現、± : 弱い明らかな発現、— : 全く発現していない。

【0046】

このように、分化の方向をサイトカインの組合わせによって、自由に制御できる。言い方を変えれば、未分化の状態にある細胞を分化させずに、あるいは機能的に分化した細胞でも機能を維持したまま、維持・増幅も可能である。

(2-3) これらの分化制御は連続的にサイトカイン類を与えたものであるが、必ずしも連続的にサイトカイン類を与える必要がなく、与えるタイミングを選ぶことによって分化の制御が可能である。このことについて、TBR 31-2 と TBR 10-1 株を例に具体的に述べる。

(2-3-1) 以下に TBR 31-2 の発育段階を図2に従って説明する。

【0047】

第1発育段階: 若い未熟な、細胞の突起を盛んに伸長させており、かつ増殖段階に入っていない細胞。

【0048】

第2発育段階: 細胞数が増大する直前の段階にあり、且つ細胞の突起を盛んに伸長させ、隣接する細胞の突起同士の接触が起こる直前～直後にあり、細胞体積の膨張が最大になった細胞。

【0049】

第3発育段階前期: 対数増殖的な発育が開始され、隣接する細胞の突起同士の接触が90%以上起こった状態にある細胞から、細胞本体同士が完全に接触して増殖する面積がない状態を100とした時に、細胞の密度が60%に達した状態にある細胞、すなわち60%コンフルエントの状態になる細胞。

【0050】

第3発育段階後期: 対数増殖的に活発に増殖している60%コンフルエント状態の細胞から増殖がとまりつつある100コンフルエント状態に向かっている細胞であり、かつ成熟した細胞に向かいつつある細胞。

【0051】

第4発育段階前期: 100%コンフルエント状態にある細胞が、まだわずかに増殖を行っており、増殖停止直前の細胞。

【0052】

第4発育段階後期: 細胞の増殖段階を終えた成熟した細胞。

【0053】

まず、当該株の4つの発育段階におけるOSMの平滑筋及び脂肪細胞への分化に及ぼす影響について述べる。平滑筋及び脂肪細胞への分化抑制がOSMによって起こることは先の例1で示したとおりであるが、平滑筋細胞と骨化細胞の分化抑制は発育段階で異なる。すなわち、平滑筋細胞の分化について、24日間連続してOSMを与えると、平滑筋細胞への分化が抑制されるが(例6、例1の繰り返し)、この抑制効果は第3発育段階後期以降のうち、特に第4発育段階の後期のみを与えるだけで得られる(例8と12)。しかしながら、第1から第3発育

段階前期の間で連続的にOSMを与えると、平滑筋分化が逆に促進される（例7）。一方、脂肪細胞の分化について、24日間連続してOSMを与えると、脂肪細胞への分化が抑制されるが（例6）、この抑制効果は第3発育段階を除くすべての発育段階で抑制される（例7、8、9及び12）。

【0054】

しかしながら、第3発育段階の後期～第4発育段階前期でOSMを与えると、脂肪細胞への分化が促進される（例10、11）。

【0055】

このように、幹細胞の発育段階における平滑筋細胞への分化抑制は増殖段階を終えた成熟した細胞で起こり（第4発育段階）、脂肪細胞への分化抑制は増殖を終えつつあり、成熟した細胞へと向かいつつある細胞で起こった（第3発育段階後期～第4発育段階前期）。また平滑筋細胞への分化促進はまだ未熟な状態にある細胞から活発に増殖している対数増殖期にある細胞で起こり（第1～3発育段階）、脂肪細胞への分化促進は増殖が停止する直前の成熟した細胞に向いしつつある細胞で起こる（第3発育段階後期～第4発育段階後期）。結果は表-7（または図4（b））を参照されたい。

【0056】

【表 7】

表-7 間葉系幹細胞 TBR 31-2 の平滑筋及び脂肪への分化に及ぼす OSM の効果 (RITC 80-7、37°C、24日間)

	発育段階と OSM 処理 (-)						分 化 能	
	第 1	第 2	第 3 前期	第 3 後期	第 4 前期	第 4 後期	平滑筋 (α -アクチン)	脂肪細胞
例 6							—	0 *
例 7							+++	8
例 8							+	2
例 9							++	12
例10							++	30
例11							++	0
例12							+	5
比較例 2							++	16

* : 3.8mm²あたりの脂肪細胞数を万遍なく 5箇所測定し、その平均値を示す。

【0057】

記号：図 4 (b) による、平滑筋の分化マーカー α -sm-Actin の発現を化学発光によって検出したときの発現量の程度を示す。+++：強い発現、++：やや強い発現、+：明らかな発現、—：全く発現していない。

【0058】

これらの結果が示すように、幹細胞の発育過程の各段階に応じてサイトカイン類の効果が異なり、与えるタイミングを選択することによって平滑筋細胞と脂肪細胞への分化の比率を自由に制御することができる。

(2-3-2) 別の細胞株である TBR 10-1 を例に述べる。例 13~24 (例 13~17 は参考例)、および比較例 2 に使用した株化した間葉系幹細胞 TBR 10-1 は前述の非特許文献 3 または 4 に記載されているとおりのものであり、平滑筋細胞へと分化することが示された (FEBS Letters 481:193-

196、2000)。本発明者は同株と表-5に示す α -MEM培地と高い血清濃度のウシ胎仔血清(10% FBS)を用いて培養条件を詳細に研究し、平滑筋細胞のほかに骨化細胞及び内皮細胞に分化することを見出し、3つの表現型に分化する能力をもつ多能性幹細胞であることを明らかにした(図1-bおよび表-8参照)。さらにこれらの分化の比率を、無血清または低濃度血清0.7% FBSのRITC培地とサイトカイン類によって自由に変えることができる技術を開発した。

【0059】

【表8】

表-8 間葉系幹細胞 TBR 10-1 の平滑筋、骨への分化に及ぼす
サイトカイン類の影響 (RITC 80-7、37°C、14日間)

分化能	例13	例14	例15	例16	例17	比較例3
	OSM (10ng/ml) *	BMP-2 (20ng/ml)	BMP-4 (20ng/ml)	GDF-5 (100ng/ml)	TGF- β 2 (10ng/ml)	
平滑筋 (sm-MLCK)	-	++	++	++	-	±
骨化(A1P 活 性の細胞%)	10	0	2	9	0	0

*: () 内の数値は添加した培地中の最終濃度を示す。

【0060】

記号: 図5(a)による、平滑筋の分化マーカーsm-MLCKの発現を化学発光によって検出したときの発現量の程度を示す。++: やや強い発現、±: 弱いながらも発現、-: 全く発現していない。

【0061】

すなわち、平滑筋細胞の分化マーカーであるミオシン軽鎖キナーゼ蛋白の発現と骨化細胞への分化の結果が示すように(例13~17; 表-8および図5(a)参照)、当該株の平滑筋への分化はOSMとTGF- β 2によって阻害される。しかし、BMP-2、BMP-4及びGDF-5存在下では、平滑筋への分化

を促進する。一方、滑化細胞への分化はOSMとGDF-5の存在下で促進される。特に、OSMによって平滑筋と骨化細胞への分化が互いに逆方向に誘導されることから、骨分化と平滑筋分化は密接な関係で制御されていることを意味し、骨化と平滑筋化の分化能を異にする幹細胞の分化段階が複数存在する可能性がある。

【0062】

TBR10-1株の例では、当該幹細胞の発育過程は図3に示すとおり、大きく4つの段階に分けることが可能である。以下、各生育相についての詳細は、TBR32-1の生育相についての説明を参照されたい。

【0063】

例18～24（下記表-9および図5（b）参照）に示すように、TBR10-1株の発育過程の各段階に応じてサイトカイン類を与えると、連続して与えたときと全く異なる分化方向を示す。すなわち、連続してBMP-2を与えると、平滑筋分化が優位に進行する。またBMP-2による平滑筋の分化の促進効果は、必ずしも連続して与える必要がなく、細胞増殖が盛んな第3発育段階から成熟した細胞にある第4発育段階でも優位に認められる。未成熟な細胞にある第1～2の発育段階では、BMP-2による平滑筋への分化促進効果は観察されない（例19）。

【0064】

【表 9】

表-9 間葉系幹細胞 TBR 10-1 の平滑筋の分化に及ぼす BMP-2 の効果
(RITC 80-7、33°C、15日間)

	発育段階とBMP-2処理(一)						分化能
	第1	第2	第3 前期	第3 後期	第4 前期	第4 後期	平滑筋 (sm-MLCK)
例 18							+++
例 19							+
例 20							++
例 21							++
例 22							++
例 23							++
例 24							++
比較例 4							±

【0065】

記号：図5(b)による、平滑筋の分化マーカー α -sm-Actin の発現を化学発光によって検出したときの発現量の程度を示す。+++：強い発現、++：やや強い発現、+：明らかな発現、±：弱い明らかな発現、-：全く発現していない。

【0066】

以上より、本発明に従えば、例えばOSMの脂肪細胞への分化に対する効果の例(例6～12)に示すように、幹細胞の培養系をマイクロウェルなどを用いて分化誘導物質や抑制物質などの新薬の開発する場合、幹細胞のどの発育段階を選択して新薬を評価するかが重要であり、選択する発育段階によって、スクリーニングされる検体の評価が全く逆の結果になる。また再生医療分野における細胞移植用として細胞を提供する場合、これらサイトカイン類の種類の選択や濃度、添加のタイミングを制御して培養することにより、最適な分化段階にある細胞の提供が可能になる。例えば、血管を構成する内皮細胞と平滑筋への適度の分化度合を兼ね備えた、あるいは、内皮細胞、平滑筋及び心筋の適度の分化度合を兼ね備

えた細胞の提供が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

(a) は TBR32-2 の分化誘導の結果を示す図に代わる細胞の写真であり、(b) は TBR10-1 の分化誘導の結果を示す図に代わる細胞の写真である。

【図 2】

TBR32-2 の増殖曲線と発育段階を示すグラフである。

【図 3】

TBR10-1 の増殖曲線と発育段階を示すグラフである。

【図 4】

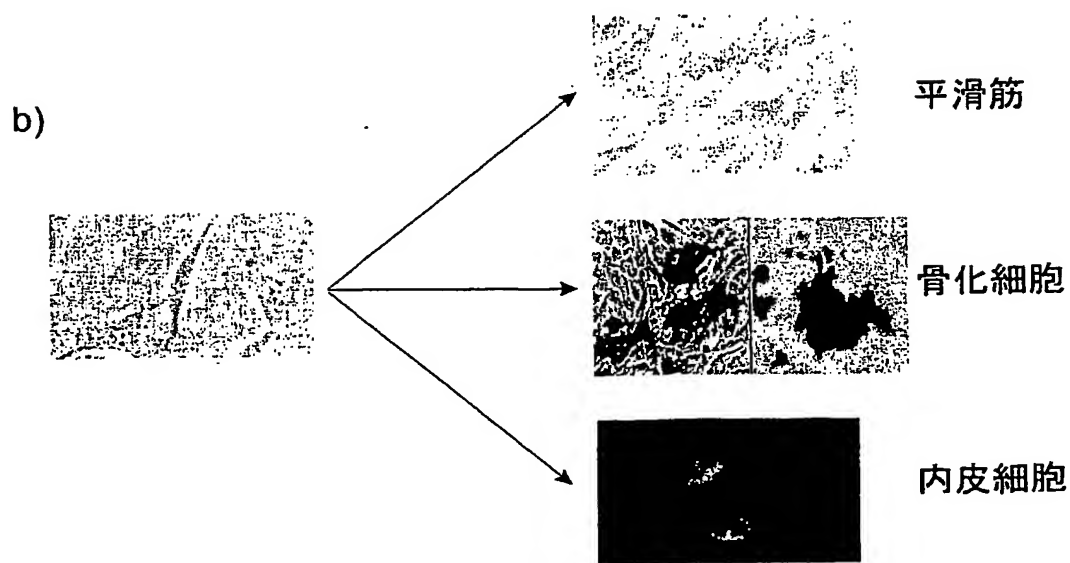
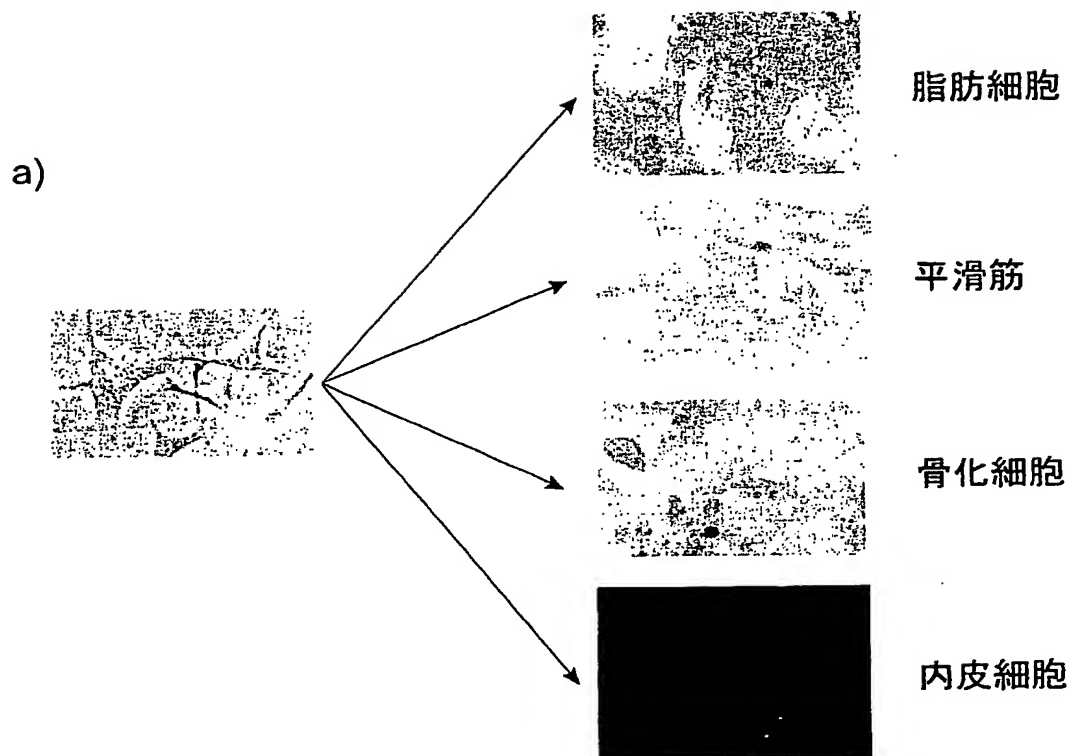
(a) 例 1～5 および比較例 1 についての、そして (b) は例 6～12 についてのゲル電気泳動後のウエスタン・ブロッティングの結果を示す図に代わる写真である。

【図 5】

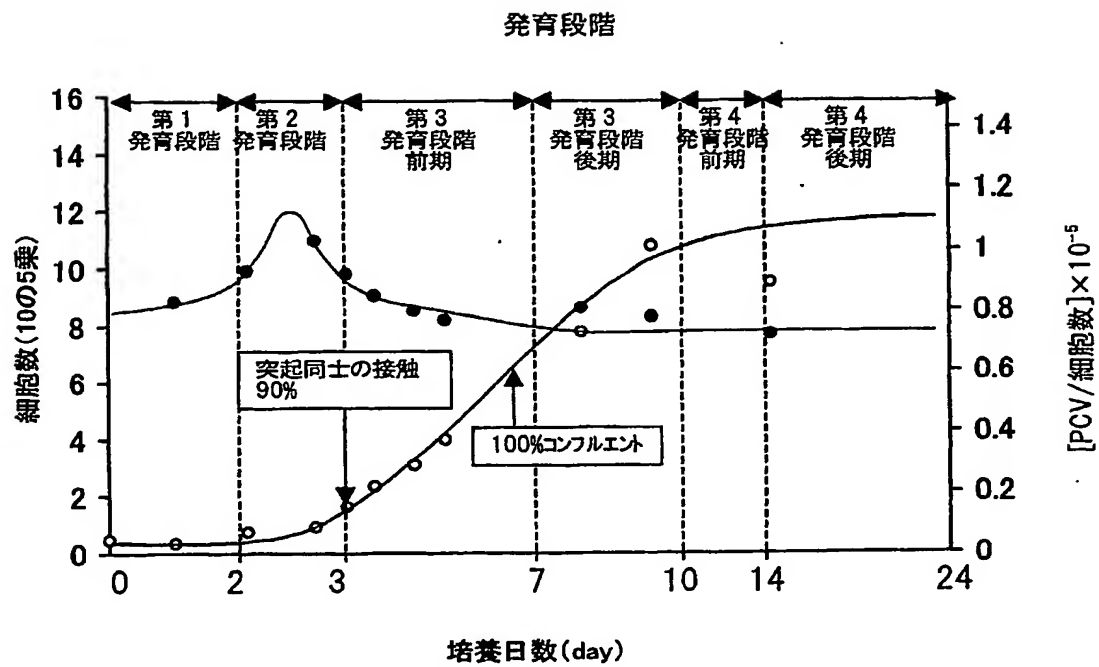
(a) 例 13～17 および比較例 2 についての、そして (b) は例 18～24 および比較例 3 についてのゲル電気泳動後のウエスタン・ブロッティングの結果を示す図に代わる写真である。

【書類名】 図面

【図 1】

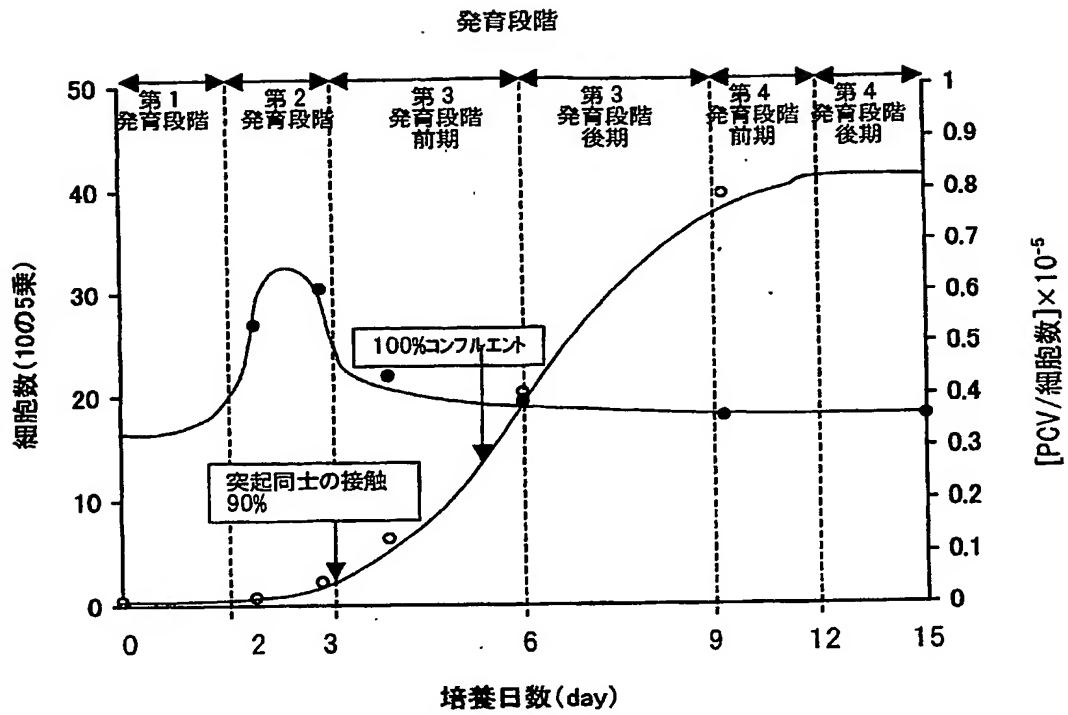


【図2】



- 細胞数
- Packed cell volume:PCV

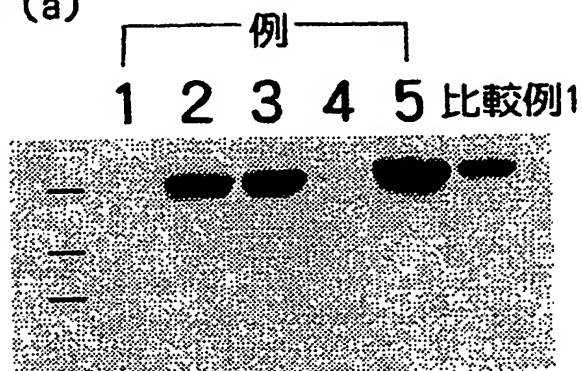
【図 3】



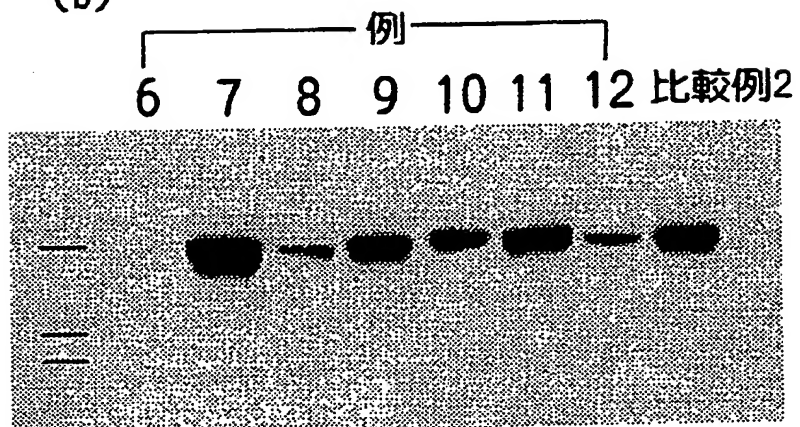
- 細胞数
- Packed cell volume:PCV

【図 4】

図4 (a)

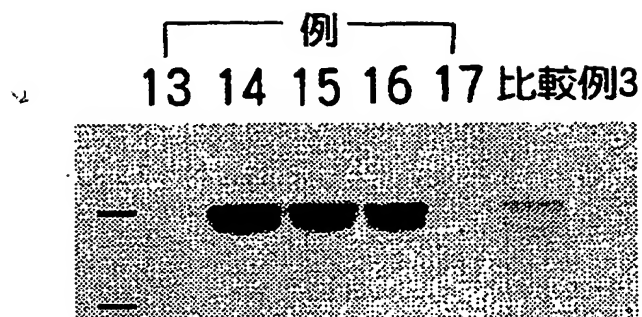


(b)

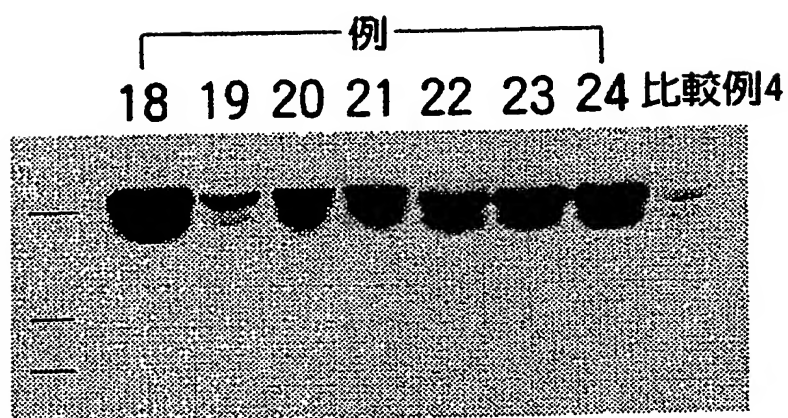


【図 5】

図5 (a)



(b)



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 動物細胞の分化誘導を的確に行う手段の提供。

【解決手段】 動物細胞の適切な生育フェーズのみにおいて、該細胞をサイトカインと接触させる、細胞の分化誘導方法。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届
【提出日】 平成15年10月 1日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003- 95242
【承継人】
【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区南吉成六丁目 6 番 3 号
【氏名又は名称】 株式会社ファクト
【承継人代理人】
【識別番号】 100060782
【弁理士】
【氏名又は名称】 小田島 平吉
【選任した代理人】
【識別番号】 100094293
【弁理士】
【氏名又は名称】 藤井 幸喜
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 019666
【納付金額】 4,200円
【その他】 持分譲渡証書及び委任状を同日付手続補足書により提出。同意書
は同日付で提出の特願 2 0 0 3 - 0 8 3 1 0 6 の出願人名義変更
届に係る手続補足書に添付の同意書を援用します。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-095242
受付番号	50301631822
書類名	出願人名義変更届
担当官	田丸 三喜男 9079
作成日	平成16年 2月12日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	503359544
【住所又は居所】	宮城県仙台市青葉区南吉成六丁目6番3号
【氏名又は名称】	株式会社ファクト

【承継人代理人】

申請人

【識別番号】	100060782
【住所又は居所】	東京都港区赤坂1-9-15 日本自転車会館内
【氏名又は名称】	小田島 平吉

【選任した代理人】

【識別番号】	100094293
【住所又は居所】	東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館 小田島特許事務所
【氏名又は名称】	藤井 幸喜

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003- 95242
【承継人】
【識別番号】 503360115
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代表者】 沖村 憲樹
【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法
 人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 0
 3-5214-8486 FAX 03-5214-8417
【提出物件の目録】
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかか
 る一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
【物件名】 登記簿謄本 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかか
 る一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2003-095242

出願人履歴情報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏名

科学技術振興事業団

特願 2003-095242

出願人履歴情報

識別番号

[503110288]

1. 変更年月日

2003年 3月25日

[変更理由]

新規登録

住 所

宮城県仙台市青葉区八幡五丁目3番10-402号

氏 名

帯刀 益夫

特願 2003-095242

出願人履歴情報

識別番号

[503110392]

1. 変更年月日

[変更理由]

住所

氏名

2003年 3月25日

新規登録

宮城県仙台市青葉区小松島二丁目11番7号

鈴木 義久

特願 2003-095242

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[503360115]

1. 変更新月日

2003年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構

特願 2 0 0 3 - 0 9 5 2 4 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 5 9 5 4 4]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

宮城県仙台市青葉区南吉成六丁目 6 番 3 号

氏 名

株式会社ファクト

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**